



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ALANA RODRIGUES FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÉSTERES
BENZOICOS ESTRUTURALMENTE RELACIONADOS FRENTE A
ESPÉCIES DE *Candida***

João Pessoa

2016

ALANA RODRIGUES FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÉSTERES
BENZOICOS ESTRUTURALMENTE RELACIONADOS FRENTE A
ESPÉCIES DE *Candida***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Farmácia do Centro de Ciências da Saúde
da Universidade Federal da Paraíba, como requisito
parcial para a obtenção do título de Bacharel em
Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa.

João Pessoa

2016

F383a

Ferreira, Alana Rodrigues.

Avaliação da atividade antifúngica de ésteres benzoicos estruturalmente relacionados frente a espécies de Candida / Alana Rodrigues Ferreira. - - João Pessoa: [s.n.], 2016.

42f. : il.

Orientador: Damião Pergentino de Sousa.

Monografia (Graduação) – UFPB/CCS.

1. Ésteres benzoicos. 2. Atividade antifúngica. 3. Candida spp.

BS/CCS/UFPB


CDU: 547-326(043.2)

ALANA RODRIGUES FERREIRA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE ÉSTERES
BENZOICOS ESTRUTURALMENTE RELACIONADOS FRENTE A
ESPÉCIES DE *Candida***

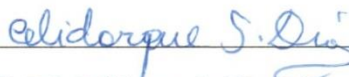
Aprovado em: 10/06/2016

BANCA EXAMINADORA:



Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa

Orientador



Prof.ª Dr.ª Celidarque da Silva Dias

Avaliadora



Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro

Avaliador

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, pelo dom da vida e bênçãos concedidas ao longo da minha história.

Aos meus pais, Maria Leunides Ferreira e Alex Sandro Rodrigues e ao meu irmão, Alann Rodrigues, pelo apoio incondicional. Agradeço, especialmente aos meus pais, todo o esforço feito para que eu chegasse ao fim de mais uma jornada; também pelo carinho, cuidado, conselhos e todo o amor. Essa vitória, eu dedico à eles, que são o meu porto seguro.

Aos demais familiares: Nerileuza, Janaina, Tia Lunga, Tia Sandra e Tia Sulene pelo apoio, incentivo e ajuda que sempre me deram. Ao meu querido e amado Tio Naldo que também é autor dessa vitória e infelizmente nos deixou no início desse ano, mas sempre me apoiou e cuidou de mim com um amor de pai. Eternas saudades.

Ao meu namorado, João Paulo Gomes, pelo apoio incondicional, carinho, compreensão, incentivo e ajuda com absolutamente tudo e sempre que precisei.

Aos amigos que fiz durante a graduação, pelo apoio; em especial, às minhas amigas-irmãs: Ednamarah, Rayssa e Tamires; que sempre estiveram e continuarão comigo, pelo companherismo, carinho, ajuda e incentivo durante todos esses anos.

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Damião Pergentino de Sousa, pelas oportunidades oferecidas, pela confiança depositada em mim, por todo o aprendizado, desde o primeiro ano de Iniciação Científica e pela disposição em ajudar sempre que necessário. Agradeço também à todos os professores que fizeram parte da minha caminhada e me passaram um pouco do seu conhecimento.

À todos os amigos do Laboratório de Química Farmacêutica: Ricardo, Flávio, Anne, Marianna, Lázaro, Ana Júlia e Raynne; pelo aprendizado, trabalho em equipe, conversas e incentivo durante a pesquisa.

RESUMO

Título: Avaliação da atividade antifúngica de ésteres benzoicos estruturalmente relacionados frente a espécies de *Candida*

Os derivados benzoicos já foram relacionados à capacidade antioxidante, anti-inflamatória, citotóxica (de células cancerígenas), antiviral, antibacteriana e antifúngica, representando um interesse crescente no campo científico. No presente estudo, foi investigada a atividade antifúngica de uma coleção de ésteres derivados de ácidos benzoicos frente à espécies patogênicas do gênero *Candida*, causadores do amplo conjunto de infecções fúngicas conhecido por Candidíase. Utilizou-se a reação de esterificação catalisada por ácido para a obtenção dos ésteres avaliados e os testes antifúngicos foram realizados com o método de microdiluição em caldo. O principal objetivo do trabalho foi avaliar a influência da presença e posição dos diferentes grupos substituintes do anel aromático dos ésteres, entre eles: -OH, -CH₃, -Ar, e -NO₂, na atividade biológica. Os resultados mostraram-se satisfatórios, visto que as substâncias bioativas apresentaram de ótima à moderada bioatividade; as melhores CIM variaram entre 256µg/mL e 64µg/mL, esta última foi apresentada pelo *p*-hidroxibenzoato de metila, frente as espécies *C. krusei* e *C. parapsilosis*. Algumas observações foram feitas em relação a influência dos substituintes nessa bioatividade: a metila na posição *para* do anel contribuiu para a inatividade dos compostos em questão; a hidroxila na mesma posição melhorou a bioatividade em alguns casos, sendo também importante para a interação com componentes das membranas fúngicas através de pontes de hidrogênio; o grupo nitro, através de sua capacidade redutora, pode ter sido relevante para a bioatividade do respectivo éster e a presença de um segundo anel aromático, nas posições *orto* ou *para*, garantiu a bioatividade das substâncias bifenílicas. Os resultados apresentados no estudo tem relevância na pesquisa de uma substância com melhor perfil biológico que possa então ser utilizado no desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos.

Palavras-Chave: Ésteres benzoicos. Atividade antifúngica. *Candida* spp.

ABSTRACT

Title: Antifungal activity evaluation of structurally related benzoic esters against *Candida* species

The benzoic derivatives have been related to antioxidant activity, anti-inflammatory, cytotoxic (cancer cell), antiviral, antibacterial and antifungal, an growing interest in the scientific field. In the present study, it was investigated the antifungal activity of a collection of benzoic acids esters derivatives, against the pathogenic species of *Candida* genus; causing the broad espectrum of fungal infections known as candidiasis. It was used the esterification catalyzed by acid to obtain the evaluated esters and the antifungal tests were performed with the microdilution broth method. The main objective of this study was to evaluate the influence of the presence and position of the various substituents of the aromatic ring of the esters, including: -OH, -CH₃, -Ar, NO₂, in the biological activity. The results were satisfactory. The bioactive substances showed good to moderate the bioactivity; the best MIC vary between 256µg / ml and 64µg / ml, this last one was presented by *p*-hydroxybenzoate methyl ester, against *C. krusei* and *C. parapsilosis* species. Some comments were made about the influence of substituents in this bioactivity: the methyl group in *para* position of the ring contributed to the inactivity of the compounds in question; the hydroxyl group in the same position improved bioactivity in some cases, being important for interaction with components of the fungal membrane through hydrogen bonding; the nitro group, through its reducing ability, may have been relevant to the bioactivity of the respective ester and the presence of a second aromatic ring in the *ortho* or *para* position, guarantee the bioactivity of the biphenyl substances. The results presented in the work presented relevance to the search of a compound with improved biological profile which can be used in the development of new antifungal drugs.

KEYWORDS: Benzoic esters. Antifungal activity. *Candida* spp.

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura do ácido benzoico.....	19
Figura 2 - Reações gerais dos métodos de preparação de ésteres.....	22
Figura 3 - Mecanismo da reação de esterificação catalisada por ácido.....	23
Figura 4 - Esquema da reação de obtenção dos ésteres.....	25
Figura 5 - Ésteres preparados.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tempo de reação, rendimento e aspecto dos ésteres preparados.....	27
Tabela 2: Resultados da avaliação da atividade antifúngica em CIM ($\mu\text{G/mL}$) contra <i>Candida</i> spp.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

µg – Micrograma

AIDS - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ATCC – American Type Culture Collection

CCS – Centro de Ciências da Saúde

CFM – Concentração Fungicida Mínima

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

h – Hora

IV – Infravermelho

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

LM – Laboratório de Micologia

mg – Miligrama

mL – Mililitro

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

UFC – Universidade Federal do Ceará

UFPB – Universidade Federal da Paraíba

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	13
2.1 O GÊNERO <i>CANDIDA</i>	13
2.2 CANDIDÍASE	14
2.3 TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR <i>Candida</i> spp. E RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS DISPONÍVEIS	16
2.4 ÉSTERES DERIVADOS DE ÁCIDOS BENZOICOS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA	19
2.5 PROPRIEDADES GERAIS E PREPARO DOS ÉSTERES	21
3. OBJETIVOS	24
3.1 OBJETIVO GERAL	24
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4. METODOLOGIA	25
4.1 PREPARAÇÃO DOS ÉSTERES	25
4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÉSTERES BENZOICOS	28
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
5.1 DADOS ESPECTROSCÓPICOS DOS ÉSTERES BENZOICOS PREPARADOS	29
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÉSTERES BENZOICOS PREPARADOS	32
6. CONCLUSÕES	37
REFERÊNCIAS.....	38

1. INTRODUÇÃO

As infecções fúngicas passaram a receber significativa atenção desde as duas últimas décadas, por tornarem-se mais frequentes, tanto pela melhoria das técnicas de identificação, como pelo aumento do número de indivíduos suscetíveis a tais infecções. O avanço no campo da medicina, do diagnóstico e tratamento de várias enfermidades, aumentou a sobrevivência de pacientes imunocomprometidos, estes são os principais acometidos por infecções fúngicas e geralmente desenvolvem quadros de maior gravidade. Com isso, o uso de medicamentos antifúngicos tornou-se vasto e muitas vezes inadequado, abrindo espaço para o surgimento de microrganismos resistentes a estes medicamentos (BARBEDO; SGARBI, 2010; SIDRIM; ROCHA, 2004 p. 25-26).

Por essas duas principais razões, pesquisas são direcionadas para a investigação da capacidade antifúngica contra patógenos humanos, de compostos que, se bioativos, possam vir a ser utilizados em estudos no desenvolvimento de novos fármacos antifúngicos. Entre os fungos de considerável interesse médico estão os do gênero *Candida*, por constantemente colonizarem e infectarem o hospedeiro humano causando a candidíase, termo referente ao amplo espectro de infecções superficiais e oportunistas que se manifestam de maneira variada (BARBEDO; SGARBI, 2010; MAUBON et al., 2014).

Os derivados do ácido benzoico são largamente utilizados na indústria química, em produtos de consumo e até mesmo em produtos farmacêuticos como conservantes antimicrobianos. São também facilmente encontrados na natureza. Na literatura, pesquisas demonstram que tais compostos são essenciais para plantas, por estarem envolvidos em sua fisiologia, mecanismos de reprodução, na proteção contra insetos e microrganismos patogênicos. Inclusive, estudos reportam que a produção desses componentes nas plantas cresce durante infecções por bactérias e/ou fungos. Assim sendo, o ácido benzoico e seus derivados têm despertado o interesse do campo científico e, suas propriedades químicas e biológicas têm sido largamente estudadas, inclusive, sua capacidade antifúngica (AMBORABÉ et al., 2002; BRAVO; SOURCES; SIGNIFICANCE, 1998; LÓPEZ; MING; TOWERS, 2002; ŚWISŁOCKA et al., 2013).

O presente trabalho propõe analisar as características estruturais que são determinantes ou significativas para uma melhor bioatividade dos compostos avaliados, nesse caso, ésteres derivados de ácidos benzoicos frente a *Candida* spp. Estudos que envolvem uma relação entre a estrutura química com a atividade biológica de moléculas bioativas têm contribuído na

pesquisa e desenvolvimento de novos potenciais agentes antimicrobianos. Através de tais análises é possível racionalizar a procura de estruturas com as propriedades desejadas e fornecer subsídios científicos para a síntese e testes de novas moléculas (ALMEIDA et al., 2010; ARROIO; HONÓRIO; DA SILVA, 2010).

Normalmente, estes estudos envolvem a análise comparativa de uma série de compostos análogos que diferem entre si pela presença de um ou mais grupos substituintes em posições definidas na estrutura química que é comum a todos, justamente para avaliar os fatores estruturais que possam influenciar na bioatividade. Para pesquisas mais apuradas é possível utilizar sofisticadas técnicas computacionais e analisar inúmeros parâmetros como densidade eletrônica, possibilidade de interações intermoleculares, dentre outras, com a finalidade de determinar as características específicas que resultam na atividade biológica (ALMEIDA et al., 2010; ARROIO; HONÓRIO; DA SILVA, 2010).

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 O GÊNERO *CANDIDA*

De uma maneira geral, os fungos são seres eucarióticos, filamentosos ou leveduriformes; podem ser encontrados em praticamente todos os ambientes, como por exemplo: plantas, solo, água, ar. Conseguem adaptar-se a condições diversas e também ocorrem no organismo humano, fazendo parte da microbiota normal. Desempenham importantes funções nos ecossistemas em que são encontrados, por degradarem a matéria orgânica (atuando como organismos saprófitos), podem ainda viver em simbiose com outros seres vivos e, por fim, há espécies que nutrem-se a partir do parasitismo de humanos e animais, causando as infecções fúngicas também conhecidas por micoses (MORAES; PAES; HOLANDA, 2009 p. 399-405).

O gênero *Candida* abriga fungos caracterizados como leveduriformes, ou seja, apresentam-se como estruturas ovais e arredondadas (blastocónídeos) associados ou não a hifas verdadeiras ou pseudohifas e outras estruturas fúngicas (SIDRIM; ROCHA, 2004 p. 89).

O habitat dessas leveduras é bastante amplo, inclusive, elas podem ser encontradas na microbiota das mucosas bucal, gastrintestinal e genital do organismo humano, vivendo como comensais. O gênero contém cerca de 200 espécies e, ao menos 10% desse total são considerados patógenos humanos. Entre os principais estão: *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*; esta primeira espécie é a mais frequentemente envolvida em casos de candidíase, ela normalmente habita o aparelho digestivo e a cavidade oral (COSTA, 2015; OLIVEIRA, 2014).

O potencial patogênico de *Candida* spp. está relacionado à condição de suscetibilidade do indivíduo e aos fatores de virulência apresentados pelas espécies. Primeiramente, essa suscetibilidade é dada por fatores que levam à imunidade baixa do organismo, ou seja, tratamentos imunossupressores para diversas enfermidades; imunodeficiências congênitas ou adquiridas como a AIDS/SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida), doenças degenerativas, procedimentos cirúrgicos tais como o transplante, são condições facilitadoras para a proliferação das espécies de *Candida*, na maioria dos casos, ocorre a modificação da sua condição de comensal para patogênica em determinada mucosa do organismo e invasão dos tecidos humanos. Além disso, o uso de antimicrobianos de amplo espectro (diminuem a quantidade de bactérias da microbiota, dando espaço para o crescimento fúngico) também

facilita a proliferação de *Candida* spp. (BARBEDO; SGARBI, 2010; SIDRIM; ROCHA, 2004 p. 265-266).

Atrelado à questão da suscetibilidade do hospedeiro estão os atributos de virulência destes microrganismos, dos quais pode-se citar alguns dos principais: a presença de proteínas conhecidas como adesinas na parede celular que facilitam a adesão das leveduras às células do hospedeiro, a produção de enzimas como proteinases e lipases (invasão do hospedeiro), a capacidade de formar estruturas filamentosas como hifas e pseudohifas que podem dificultar mecanismos de fagocitose (um dos principais meios de defesa do organismo contra esse tipo de infecção), também produzem alguns metabólitos que podem desencadear processos alérgicos, dentre outros (KARKOWSKA-KULETA; RAPALA-KOZIK; KOZIK, 2009; SILVA et al., 2012).

As espécies de *Candida* também são capazes de aderir à superfícies de materiais médico-hospitalares como o cateter, formando biofilmes, que consistem em uma comunidade microbiana unida e aderida à superfície de materiais, envolta por estruturas poliméricas; estes microrganismos tem propriedades diferenciadas e podem apresentar resistência a antifúngicos e às defesas do hospedeiro (SILVA et al., 2012).

2.2 CANDIDÍASE

Pode-se dizer que a candidíase é a infecção fúngica oportunista mais comum atualmente, é uma das mais frequentes em ambiente hospitalar, incluindo aquelas que ocorrem em sítios cirúrgicos, do trato urinário e do sangue. Isso ocorre principalmente devido à onipresença das espécies de *Candida*, bem como ao aumento do número de indivíduos com fatores de risco para o desenvolvimento da infecção (PEIXOTO et al., 2014).

A infecção ocorre principalmente de maneira endógena, visto que as espécies vivem como comensais em algumas mucosas do organismo e ao encontrarem condições adequadas (desequilíbrio da microbiota, defesas imunológicas debilitadas) multiplicam-se e invadem os tecidos causando as manifestações típicas. Em indivíduos saudáveis a candidíase apresenta-se apenas como uma infecção de pele ou mucosas, já naqueles com algum dos fatores de risco mencionados a doença manifesta-se com maior gravidade, podendo até ocorrer quadros sistêmicos e invasão de diversos órgãos (SIDRIM; ROCHA, 2004 p. 265-266).

As manifestações clínicas das candidíases são variadas e divididas em: candidíase cutâneo-mucosa (acometimento de pele, unhas, mucosas orofaríngeas e genitais), candidíase

invasiva disseminada (pode-se encontrar quadros de candidemia, de sintomatologia cardíaca, digestiva, respiratória, hepática, ocular e do sistema nervoso central, sendo manifestações isoladas ou associadas) (PEIXOTO et al., 2014).

Entre as candidíases cutâneo-mucosas mais comumente documentadas, pode-se citar a candidíase vulvovaginal e a candidíase oral. Cerca de 75% das mulheres em idade fértil apresentam candidíase vulvovaginal pelo menos uma vez na vida, esse fato pode ser uma causa de diminuição da qualidade de vida. A candidíase oral principalmente ocasionada por *C. albicans* é a infecção oportunista de maior prevalência entre os pacientes HIV positivo, inclusive, é considerada um marcador da progressão da doença e como preditivo da deterioração imunológica dessa população, podendo levar a complicações secundárias, além de ser um desconforto. É também comum em recém-nascidos prematuros de baixo peso, que apresentam imaturidade do sistema imunológico e ficam por tempo prolongado em contato com o ambiente e materiais hospitalares, nesses pacientes a candidíase oral pode ser a porta de entrada para a colonização gastrointestinal e disseminação sistêmica da infecção; a candidíase invasiva é uma das principais causas de mortalidade relacionada à infecções oportunistas em neonatos (ARAÚJO et al., 2013; COLOMBO et al., 2013; CONTI; GAFFEN, 2010; HOLANDA et al., 2007).

A candidemia (presença de *Candida* spp. no sangue) entre as manifestações de candidíase invasiva, é um frequente desafio enfrentado em hospitais de vários países por ter um difícil diagnóstico, ser a causa de elevadas taxas de mortalidade, do aumento do tempo de internação do paciente e consequente aumento de gastos. É principalmente observada em pacientes adultos e recém-nascidos prematuros das Unidades de Terapia Intensiva (UTI) que passaram por procedimentos invasivos, fazem uso de antibióticos de amplo espectro, de tratamentos imunossupressores ou ainda que precisem utilizar materiais como o cateter venoso central. Nesses casos de candidíase sistêmica a espécie constantemente envolvida é *C. albicans*, contudo, nos últimos anos, espécies não-*C. albicans* tem sido frequentemente isoladas de pacientes com candidemia, as principais documentadas no Brasil são *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Acredita-se que a maioria dos casos seja de origem endógena, dessa forma, a disseminação de *Candida* spp. seria através do trato gastrointestinal; mas também há situações de contaminações por fontes exógenas, como materiais médico-hospitalares contaminados, a exemplo do cateter (MCCARTY; PAPPAS, 2015; WILLE et al., 2013).

2.3 TRATAMENTO DE INFECÇÕES POR *Candida* spp. E RESISTÊNCIA AOS ANTIFÚNGICOS DISPONÍVEIS

Para se iniciar um tratamento adequado frente a uma infecção por *Candida* spp. é importante, primeiramente, remover os fatores predisponentes, sempre que possível. Além disso, tem a terapia medicamentosa, e para tal é necessário o conhecimento da espécie causadora das manifestações clínicas e a realização de testes de suscetibilidade aos antifúngicos disponíveis, a fim de se fazer uso da melhor terapêutica para o paciente infectado, tentando evitar o uso exagerado e inadequado de antimicrobianos, prática essa que consiste na principal causa do desenvolvimento de mecanismos de resistência aos agentes antimicrobianos disponíveis por parte dos microrganismos (PANIZO et al., 2009).

A resistência microbiana aos agentes antimicrobianos disponíveis tem levado a sérias implicações e falhas no tratamento de infecções, portando-se como um grande desafio para a clínica. A não suscetibilidade de um certo fungo patogênico a um antifúngico é determinada em testes *in vitro*, essa resistência pode ser intrínseca, no caso, o fungo já é resistente sem ter sido exposto ao antifúngico anteriormente; ou ela pode ser adquirida, dessa forma, o fungo patogênico desenvolve (normalmente por alterações genéticas) essa resistência ao ser constantemente exposto ao determinado antifúngico. Ainda há casos em que o paciente não responde ao tratamento e a infecção torna-se persistente, mesmo o patógeno sendo suscetível ao medicamento utilizado; normalmente, essas situações ocorrem devido à alta debilidade imunológica do paciente (SANGUINETTI; POSTERARO; LASS-FLORL, 2015).

Como, desde as últimas décadas houve um aumento na quantidade de pacientes apresentando graves quadros de infecções fúngicas, os agentes antifúngicos passaram a ser mais utilizados, muitas vezes de maneira inadequada e por períodos prolongados; esse fato poderia estar favorecendo a maior ocorrência dessa resistência e, já que *Candida* spp. ocupa um largo espaço entre os causadores de tais infecções, é possível concluir que muitos isolados clínicos patogênicos do gênero desenvolveram mecanismos de resistência frente aos antifúngicos utilizados na terapêutica (EDDOUZI et al., 2013; SANGLARD, 2002; SILVA et al., 2012).

Atualmente, as principais classes de antifúngicos utilizados no tratamento da candidíase superficial ou sistêmica são: Os poliênicos, os azóis e as equinocandinas; estes agentes exercem sua ação à nível da membrana ou parede celular. Como já dito, a célula fúngica é eucariótica, a membrana é formada por fosfolipídios, proteínas e glicoproteínas; a parede celular possui polissacarídeos abundantes, associados à proteínas e elementos

microfibrilares como quitina e glucanos (COLOMBO et al., 2013; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013; SIDRIM; ROCHA; CORDEIRO, 2004 p. 41-42).

Entre os poliênicos destacam-se a nistatina, utilizada nas infecções superficiais e de mucosas e a anfotericina B, apenas utilizada em casos sistêmicos. Ambas possuem afinidade pelo ergosterol (principal esteroide das membranas fúngicas), dessa forma, ligam-se a ele formando poros por onde a célula fúngica perde seus componentes, o que resulta na morte do microrganismo. A anfotericina B tem sido utilizada por décadas no tratamento de candidíase invasiva, casos de resistência não são comuns, apenas em infecções por *C. krusei* e *C. glabrata* são necessárias doses maiores do antifúngico. Vale ressaltar que a anfotericina B possui alguns efeitos adversos, o de maior gravidade é a nefrotoxicidade; formulações do antifúngico associado a componentes lipídicos mostraram-se ter um efeito nefrotóxico menor, mas são de alto custo (COLOMBO et al., 2013; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

Com o advento dos azóis, aumentou-se a gama de antifúngicos para a escolha do agente adequado em cada caso de infecção por *Candida* spp. Os azóis são subdivididos em imidazóis e triazóis. Esta segunda subclasse é largamente utilizada de maneira profilática e no tratamento de infecções superficiais e sistêmicas, entre eles estão o fluconazol, itraconazol, voriconazol e posaconazol. O mecanismo de ação dos triazóis envolve a inibição da biossíntese do ergosterol; interferindo na formação da membrana celular fúngica (COLOMBO et al., 2013; SPAMPINATO; LEONARDI, 2013).

Os triazóis apresentam níveis reduzidos de toxicidade e um amplo espectro de ação contra *Candida* spp., por isso o seu uso foi altamente difundido, no entanto, casos de resistência a tais agentes têm sido reportados, provavelmente pelo seu uso extensivo. A resistência de *Candida* spp. é mais expressiva ao fluconazol, ele é um dos principais utilizados da classe, tanto para infecções superficiais, como sistêmicas. Algumas espécies de *Candida*, como *C. krusei* apresentam uma resistência natural ao fluconazol (COLOMBO et al., 2013; SILVA et al., 2012).

O que vem sendo observado nos casos de candidíase invasiva reportados em hospitais por todo o mundo são as espécies de *Candida* que estão causando as infecções. Normalmente, *C. albicans* é responsável pela maioria das infecções, mas estudos vêm documentando que uma considerável quantidade de pacientes está sendo infectada por espécies não-*C. albicans*, entre as principais estão *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, e *C. krusei*, a justificativa para isso está sendo atribuída ao uso difundido dos triazóis (como medida profilática e terapêutica); principalmente ao fluconazol, nesse caso, essas espécies resistentes ou menos suscetíveis aos antifúngicos estariam envolvidas em boa parte das infecções invasivas por *Candida* que

ocorrem durante o tratamento com tais medicamentos (MAUBON et al., 2014; SILVA et al., 2012).

As equinocandinas são a mais recente adição ao arsenal antifúngico. Interferem, através de inibição enzimática, na síntese de polissacarídeos essenciais para a parede celular fúngica, resultando em vulnerabilidade da célula. As principais são: caspofungina, micafungina e anidulafungina; geralmente são bem toleradas e apresentam poucos efeitos adversos. São largamente utilizadas para tratamento de candidíase invasiva, e, justamente a esse uso difundido têm sido atribuído o fato de muitas infecções estarem sendo causadas por espécies naturalmente menos suscetíveis às estes antifúngicos ou que já desenvolveram mecanismos de resistência, como *C. parapsilosis*, *C. glabrata* respectivamente. Estudos também tem reportado que isolados clínicos de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. kefyr* desenvolveram mecanismos que levam a uma menor suscetibilidade às equinocandinas. Estes achados sugerem que a resistência de *Candida* spp. e este grupo de antifúngicos está emergindo (ARENDRUP; PERLIN, 2014; MAUBON et al., 2014).

Ainda sobre a resistência apresentada por *Candida* spp. à terapia antifúngica; cabe comentar a respeito do aumento da tolerância dos biofilmes de *Candida* aos antifúngicos disponíveis. Biofilmes de *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis* e *C. glabrata*, mostraram-se menos suscetíveis ao fluconazol e anfotericina B, por exemplo. Essa resistência pode estar relacionada à dificuldade do antifúngico em penetrar na matriz e nas células do biofilme (SILVA et al., 2012).

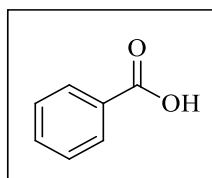
A resistência de *Candida* spp. aos antifúngicos atrelada a alta frequência com que estes microrganismos infectam o hospedeiro humano gerando variados quadros clínicos, sendo os de maior gravidade observados em pacientes imunodeprimidos, justifica a pesquisa por novos agentes ativos frente a esse grupo de patógenos humanos. Além disso, é importante destacar que o número de classes de antifúngicos disponíveis para o tratamento de infecções em geral é relativamente limitado, isso pode ser atribuído ao pequeno número de alvos para ação dos antifúngicos, já que a célula fúngica é bem semelhante às células dos hospedeiros humanos, o que limita o número de alvos, já que o antifúngico não pode ser tóxico ao hospedeiro. Dessa forma, muitas pesquisas foram e são direcionadas para o desenvolvimento de antifúngicos que tenham um sítio de ação diferenciado dos já existentes (MAUBON et al., 2014; SILVA et al., 2012).

2.4 ÉSTERES DERIVADOS DE ÁCIDOS BENZOICOS COM ATIVIDADE ANTIFÚNGICA

Aos ácidos benzoicos e derivados já foram relacionadas capacidade antioxidante, anti-inflamatória (no sentido de inibir a liberação de mediadores inflamatórios), citotóxica em células cancerígenas, antiviral, antibacteriana e também antifúngica. Segundo a literatura, derivados benzoicos são considerados compostos de baixa toxicidade (HUSEIN; JONDI; ZATAR; ALI-SHTAYEH, 2014; KANE et al., 1988; KRÁTKÝ et al., 2015; KRÁTKÝ; VINŠOVÁ; BUCHTA, 2012; NGUYEN et al., 2015; REFAAT et al., 2015; TRUSHEVA et al., 2010).

Os ácidos benzoicos são componentes orgânicos simples, a começar pelo próprio ácido benzoico que possui a estrutura química básica do grupo: um anel aromático ligado ao grupamento carboxílico (-COOH) que pode ser observada na **figura 1**; os demais possuem substituintes do anel como hidroxilas (-OH), metoxilas (-OCH₃) e metilas (-CH₃). Os principais documentados na literatura são aqueles hidroxilados, como o ácido *p*-hidroxibenzoico e o ácido gálico. Estes ácidos são encontrados na natureza em sua forma livre e, muito frequentemente, como seus correspondentes derivados esterificados (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Figura 1: Estrutura do ácido benzoico



Fonte: Elaborado pela autora.

A produção de derivados do ácido benzoico por plantas é crucial para sua resistência à infecções por fungos. Estudos têm reportado que os mecanismos de inibição do crescimento fúngico por tais compostos envolve o rompimento da membrana celular, inibição de reações metabólicas essenciais para a membrana, interrupção de processos de transportes e sinalização celular, alterações do pH intracelular e acúmulo de compostos tóxicos no interior das células fúngicas (BRUL; COOTE, 1999; LAMBERT; STRATFORD, 1999; PLODPAI et al., 2013; PODOBNIK et al., 2008).

Entre estes derivados, ésteres obtidos a partir de ácidos benzoicos têm sido relatados em estudos pela investigação da atividade antifúngica de derivados benzoicos. HELENO e

colaboradores (2013) demonstraram a atividade antifúngica do ácido *p*-hidroxibenzoico frente cepas de *Aspergillus* sp. e *Penicillium* sp. Seu derivado esterificado com um glicuronídeo também foi bioativo frente todos os fungos testados no trabalho, inclusive ele mostrou ter melhor bioatividade que o seu ácido precursor, por inibir o crescimento fúngico com menor Concentração Inibitória Mínima (CIM). POPOVA e colaboradores (2011) estudaram a composição química da própolis do Mediterrâneo e encontraram ésteres benzoicos, a exemplo de ésteres terpênicos do ácido *p*-hidroxibenzoico; tais compostos apresentaram atividade antifúngica contra *C. albicans*.

Carta e colaboradores (2011) estudaram a capacidade de inibição da anidrase carbônica por alguns ácidos benzoicos e seus respectivos ésteres. Tal enzima está presente em diversos fungos patógenos humanos, como *C. albicans*, *C. glabrata* e *Cryptococcus neoformans*. O resultado do trabalho mostrou que ácidos benzoicos hidroxilados e metoxilados bem como seus respectivos ésteres tiveram atividade significativa frente à enzima testada, apresentaram também, uma melhor seletividade frente às enzimas dos microrganismos do que às isoformas humanas que também foram utilizadas nos testes. O estudo por inibidores da anidrase carbônica, presente em fungos patogênicos, tem sido proposto como uma das alternativas de se desenvolver novos agentes terapêuticos com mecanismos diferenciados para o tratamento de infecções por bactérias e fungos.

Husein e colaboradores (2014) avaliaram a atividade antifúngica de ésteres derivados dos ácidos hidroxibenzoicos, diferentes apenas pela posição da hidroxila do anel. No estudo, o derivado com a hidroxila na posição *para* do anel aromático demonstrou melhor bioatividade frente fungos dermatófitos utilizados para o teste (*Microsporum canis* e *Trichophyton rubrum*), segundo os autores, esse resultado enfatiza a importância da posição do grupo funcional nessa atividade biológica.

Kenawy e colaboradores (2006) prepararam polímeros de poliacrilamida modificada utilizando ésteres benzoicos (com substituintes hidroxílicos no anel aromático) a fim de investigar qual a influência de tais compostos na atividade antimicrobiana dos polímeros. Como resultado, os polímeros obtidos a partir das reações da poliacrilamida com os ésteres benzoicos apresentaram atividade contra *Candida albicans*, inclusive, a atividade antifúngica foi até melhor do que a atividade antibacteriana testada no trabalho em questão.

STRIPPOLI e colaboradores (2000) avaliaram a influência de um éster do ácido gálico, o galato de propila, na atividade antifúngica, contra *C. albicans*, de imidazóis já conhecidos como agentes antifúngicos. O galato de propila não demonstrou atividade antifúngica sozinho, mas quando foi adicionado aos meios de cultura contendo o imidazol, ele

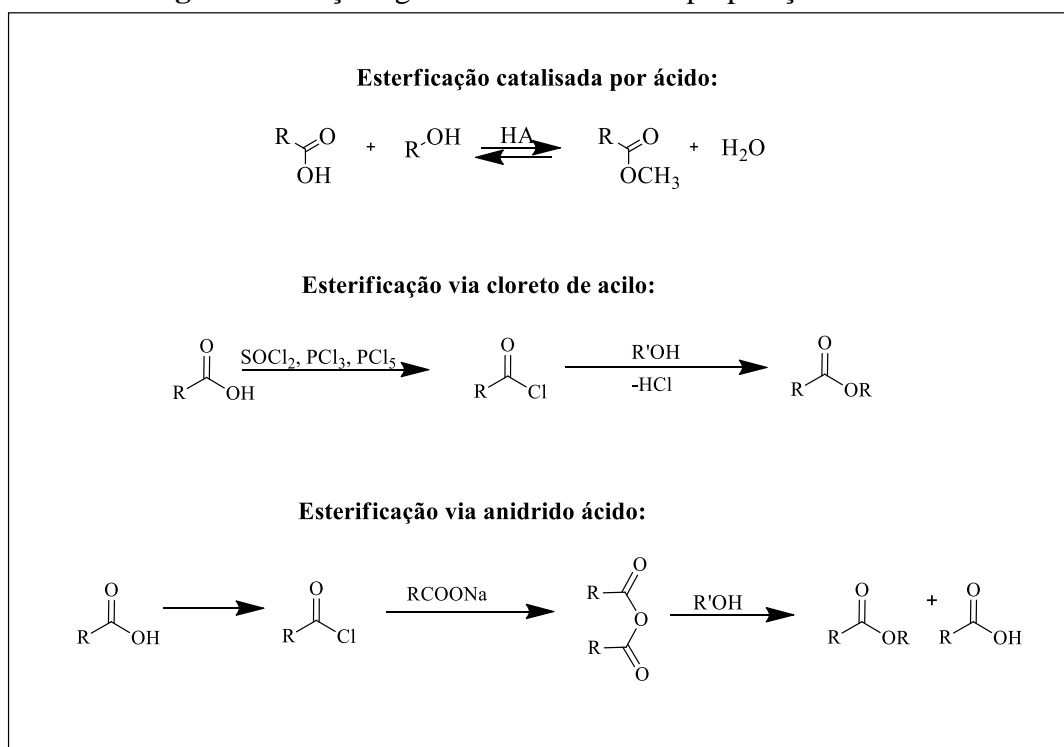
contribui para que o mesmo exercesse sua ação antifúngica em CIM menor, os autores acreditam que o éster facilita a entrada do imidazol na célula fúngica quando interage com fosfolípidios da membrana ou reforça a ação do antifúngico impedindo sua metabolização através da interação com enzimas. Vale ainda ressaltar que os autores comentam outro estudo realizado com o galato de propila em que a substância melhora a bioatividade da anfotericina B contra *C. albicans* impedindo sua auto-oxidação (o ácido gálico e seus ésteres são conhecidos por suas capacidades antioxidantes).

Diante do exposto, torna-se válida a investigação da atividade antifúngica de ésteres derivados de ácidos benzoicos frente *Candida* spp., que estão entre os principais fungos patógenos humanos.

2.5 PROPRIEDADES GERAIS E PREPARO DOS ÉSTERES

Quimicamente, os ésteres ($R-COO-R$), são compostos de baixa polaridade, possuem ponto de ebulição menor do que os ácidos de semelhante peso molecular e são muito comuns na natureza, estando normalmente associados ao odor agradável de flores, frutos e óleos vegetais (OLIVEIRA et al., 2014).

Os métodos de preparação de ésteres incluem a esterificação catalisada por ácido e esterificações via cloreto de acila e anidrido de ácido. As reações gerais de cada uma podem ser observadas na **figura 2** (SOLOMONS; FRYHLE, 2012 p. 795, 797, 799).

Figura 2: Reações gerais dos métodos de preparação de ésteres

Fonte: Adaptado do SOLOMONS; FRYHLE, 2012 p. 795, 797, 799.

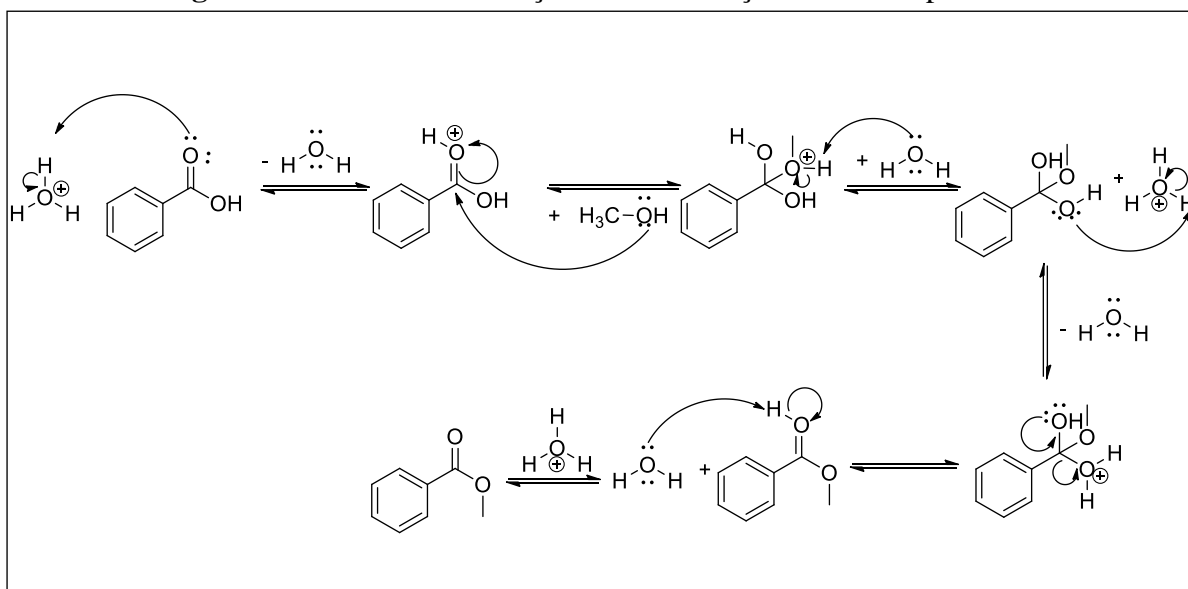
Na esterificação via cloreto de acila, o mesmo é primeiramente preparado a partir do ácido correspondente. Para isso, normalmente é utilizado o tricloreto de fósforo (PCl_3), pentacloreto de fósforo (PCl_5) ou cloreto de tionila (SOCl_2). Esse processo não precisa de catalisador e costuma-se adicionar piridina ao meio reacional para reagir com o HCl que é liberado, evitando reações indesejadas. Como visto na **figura 2**, anidridos de ácidos carboxílicos também reagem com álcoois para formação de ésteres. Os anidridos podem ser obtidos, por exemplo, através da reação do cloreto de acila com o sal sódico do ácido (SOLOMONS; FRYHLE, 2012 p. 795, 799).

Por fim, na esterificação catalisada por ácido (Esterificação de Fischer) ocorre a reação entre um ácido carboxílico e um álcool. Esse tipo de reação é reversível e acontece muito lentamente, mas ao refluxar um ácido e um álcool na presença de um ácido forte (o ácido sulfúrico, por exemplo), atinge-se o equilíbrio em poucas horas. Justamente por ser uma reação reversível (que atinge um equilíbrio), os produtos vão sendo formados e constantemente convertidos aos reagentes, então, para se ter um melhor rendimento (baseado no reagente limitante) desloca-se o equilíbrio para a formação dos produtos, isso pode ser feito acrescentando um excesso de um dos reagentes. O rendimento ainda pode ser aumentado retirando a água que vai sendo formada (SOLOMONS; FRYHLE, 2012 p. 797-798).

Entre os métodos de obtenção de ésteres mostrados, a esterificação catalisada por ácido é o procedimento mais simples e o mais utilizado tanto em escala industrial como em laboratório, está bem fundamentado na literatura e, inclusive, é a metodologia utilizada para o preparo dos ésteres deste presente trabalho (LI; ELI; LI, 2008; OLIVEIRA et al., 2014).

A Esterificação de Fischer é uma reação de adição-eliminação nucleofílica catalisada por ácido em átomos de carbono acílico (carbonila), o mecanismo pode ser observado na **figura 3**. O procedimento de preparo e purificação de ésteres precisa ser cauteloso para evitar a reação inversa ou hidrólise do mesmo, que pode ocorrer tanto no meio ácido, como também mostrado na figura 3 ou em meio básico (utilizando bases fortes) com a formação de um sal (SOLOMONS; FRYHLE, 2012 p. 797-799; OLIVEIRA et al., 2014).

Figura 3: Mecanismo da reação de esterificação catalisada por ácido



Fonte: Adaptado do SOLOMONS; FRYHLE, 2012 p. 798.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Preparar uma coleção de ésteres benzoicos estruturalmente relacionados; avaliar a atividade antifúngica dos mesmos e estabelecer uma relação entre a estrutura dos compostos obtidos e a atividade antifúngica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar nove ésteres metílicos utilizando ácidos benzoicos como materiais de partida;
- Avaliar a atividade antifúngica das substâncias obtidas frente cepas de *Candida* spp.;
- Traçar uma relação entre a estrutura e a atividade biológica dos compostos obtidos;
- Avaliar a influência dos diferentes grupos substituintes do anel aromático dos ésteres na atividade antifúngica.

4. METODOLOGIA

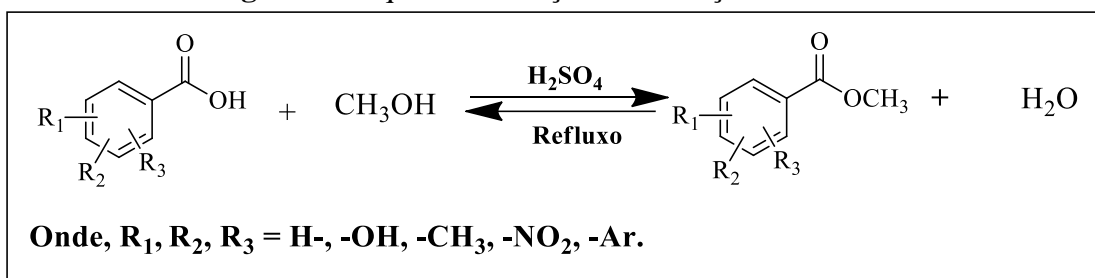
Os procedimentos experimentais de preparação dos ésteres benzoicos foram realizados no Laboratório de Química Farmacêutica localizado no Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB).

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada no Laboratório de Micologia do CCS/UFPB, coordenado pela Profa. Edeltrudes de Oliveira Lima e no Laboratório de Bioprospecção e Experimentação em Leveduras, localizado na Universidade Federal do Ceará (UFC), coordenado pelo Prof. Hélio Vitoriano Nobre Júnior, frente cepas de *Candida* spp.

4.1 PREPARAÇÃO DOS ÉSTERES

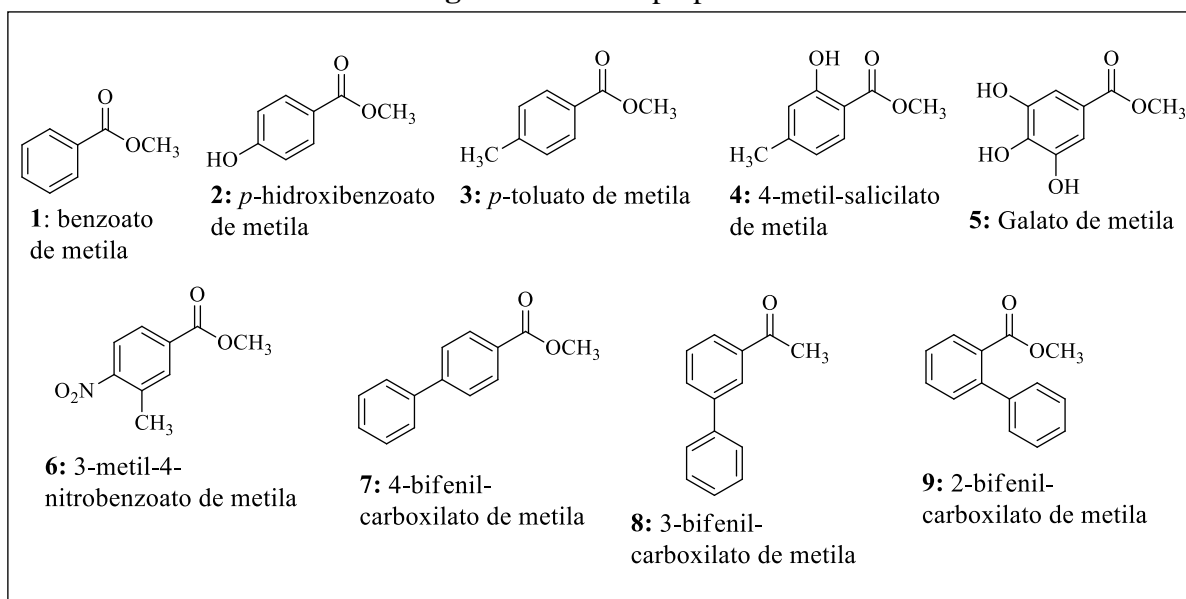
Os ésteres foram obtidos através de reações de esterificação de Fischer, entre um ácido carboxílico aromático e um álcool em excesso, tendo como catalisador o ácido sulfúrico (H_2SO_4). A reação pode ser observada na **figura 4**.

Figura 4: Esquema da reação de obtenção dos ésteres



Fonte: Elaborado pela autora.

Os ácidos utilizados como materiais de partida foram: ácido benzoico, ácido *p*-hidroxibenzoico, ácido *p*-toluico, ácido 4-metil-salicílico, ácido gálico, ácido 3-metil-4-nitrobenzoico, ácido 4-bifenil carboxílico, ácido 3-bifenil carboxílico, ácido 2-bifenil carboxílico, obtidos da empresa Sigma-Aldrich. O álcool utilizado em todas as reações foi o metanol. Os ésteres benzoicos obtidos podem ser observados na **figura 5**.

Figura 5: Ésteres preparados

Fonte: Elaborado pela autora.

O procedimento reacional foi o mesmo para a preparação de todos os ésteres: Cerca de 200 mg do respectivo ácido foi dissolvido em 40 mL de metanol, em balão de fundo redondo. Em seguida foram adicionados 0,2 mL do ácido sulfúrico (H_2SO_4). A mistura reacional foi aquecida à refluxo, em banho de óleo aquecido à cerca de 85°C e agitação magnética. As reações foram acompanhadas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando como eluente uma mistura de hexano e acetato de etila. A ausência do material de partida no meio reacional (interpretada através da ausência da mancha do mesmo na placa cromatográfica) indicou o final das reações.

Ao fim dos procedimentos reacionais o metanol foi concentrado em evaporador rotativo seguindo-se para a extração dos produtos, que foi feita utilizando o acetato de etila para as substâncias **1** à **6** e diclorometano para as substâncias **7** à **9**.

O procedimento de extração utilizado foi semelhante para todos: Após a concentração no evaporador rotativo, para retirar o excesso de metanol, o conteúdo do balão foi transferido para um funil de separação, neste foi adicionado água destilada (10 mL), o respectivo solvente para extração (10mL), separando-se a fase orgânica da fase aquosa; esta última ainda foi tratada com o solvente extrator (2 x 10mL). A fração orgânica resultante foi então tratada com uma solução de 5% de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) para neutralizar o ácido possivelmente existente ainda na fase orgânica; seguindo-se tratada com água destilada e, por fim, a fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrada para um balão de fundo redondo e levada ao rota-evaporador para concentrar o solvente, obtendo-se então o produto.

É importante destacar que na preparação do galato de metila (**5**) ocorreram algumas dificuldades na extração, levando à baixos rendimentos. Foi observado que poderia estar acontecendo a hidrólise do éster, pela presença da solução de NaHCO_3 . Portanto a extração do produto **5** foi feita sem a utilização da solução de NaHCO_3 e o mesmo foi purificado em coluna cromatográfica utilizando como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de etila com gradiente crescente de polaridade. Esse procedimento resultou em um melhor rendimento.

Na **tabela 1** estão designados os tempos de reação e os rendimentos dos respectivos ésteres obtidos.

Tabela 1: Tempo de reação, rendimentos e aspecto dos ésteres preparados

Ésteres	Tempo de reação (h)	Rendimento (%)	Aspecto
(1) benzoato de metila	5	54,0	Óleo amarelo
(2) <i>p</i> -hidroxibenzoato de metila	24	93,7	Sólido branco
(3) <i>p</i> -toluato de metila	5	87	Sólido amarelado
(4) 4-metil-salicilato de metila	6	84,6	Óleo amarelado
(5) galato de metila	5	53	Sólido branco
(6) 3-metil-4-nitrobenzoato de metila	6	83,3	Cristais amarelos
(7) <i>p</i> -bifenil-carboxilato de metila	24	94	Pó de cor creme
(8) <i>m</i> -bifenil-carboxilato de metila	24	82	Óleo escuro
(9) <i>o</i> -bifenil-carboxilato de metila	48	80,2	Óleo amarelado

Fonte: Dados da pesquisa.

As estruturas químicas dos ésteres preparados foram confirmadas por Infravermelho e Ressonância Magnética Nuclear do ^1H e ^{13}C .

4.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÉSTERES BENZOICOS

Primeiramente foram realizados os testes de atividade antifúngica dos compostos no Laboratório de Micologia da UFPB pelo grupo da Profa. Dra. Edeltrudes de Oliveira.

As cepas de *Candida* spp. utilizadas para a avaliação da atividade foram: *Candida albicans* (ATCC 76.645), *C. albicans* (LM-36); *C. albicans* (LM-P20), *C. tropicalis* (ATCC-13803), *C. tropicalis* (LM-36), *C. krusei* (LM-13) e *C. krusei* (LM-656). O método utilizado foi o de microdiluição em caldo (CLEELAND; SQUIRES, 1991; ELOFF, 1998; SOUZA et al., 2007) com a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos produtos testados; os quais foram avaliados em concentrações que variaram de 1024 até 64 µg/mL. Após a determinação da CIM foi feito o cálculo da concentração fungicida mínima (CFM). Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados expressos pela média geométrica dos valores da CIM e CFM.

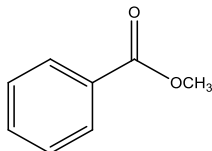
A segunda avaliação da atividade antifúngica foi realizada no Laboratório de Bioprospecção e Experimentação em Leveduras da UFC pelo grupo do Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Júnior.

Nesse segundo teste as cepas de *Candida* spp. utilizadas foram: *Candida parapsilosis* (ATCC® 22019™) e *C. krusei* (ATCC® 6258™). O método utilizado também foi o de microdiluição em caldo, de acordo com o documento M27-A3 (CLSI, 2008) havendo também a determinação da CIM das substâncias, que foram testadas em concentrações variando de 1024 - 2 µg/mL.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 DADOS ESPECTROSCÓPICOS DOS ÉSTERES BENZOICOS PREPARADOS

1- Benzoato de metila

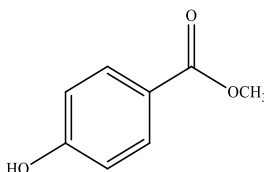


IV (cm^{-1}): 3061, 2949, 1722, 1246, 1111, 742.

RMN ^{13}C (CDCl_3 , 50 MHz): δ_{C} 52,0; 128,2; 129,4; 129,4; 130,0; 132,8; 132,8; 167,0.

RMN ^1H (CDCl_3 , 200 MHz): δ_{H} 3,91 (3H; s), 7,42 (2H; dd; $J=7,8$; 7,0 Hz), 7,53 (1H; d; $J=7,0$ Hz), 8,04 (1H; dd; $J=7,8$; 1,6 Hz)

2- *p*-Hidroxibenzoato de metila

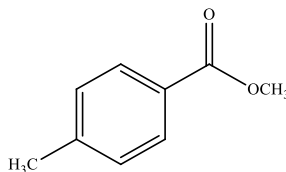


IV (cm^{-1}): 3309, 2962, 1681, 1606, 1587, 1278.

RMN ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 50 MHz): δ_{C} 51,7; 115,4; 115,4; 120,3; 131,5; 131,5; 162,0; 166,2.

RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 200 MHz): δ_{H} 3,77 (3H; s), 6,84 (2H; d; $J=8,8$ Hz), 7,81 (2H; d; $J=8,8$ Hz).

3- *p*-Toluoato de metila

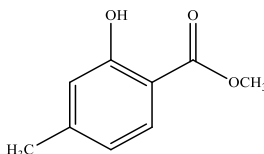


IV (cm^{-1}): 3034, 2997, 2953, 1724, 1614, 1435, 1278, 1107.

RMN ^{13}C ($\text{DMSO}-d_6$, 50 MHz): δ_{C} 21,2; 51,9; 126,9; 129,2; 129,2; 129,2; 129,2; 143,6; 166,2.

RMN ^1H ($\text{DMSO}-d_6$, 200 MHz): δ_{H} 2,37 (3H; s), 3,82 (3H; s), 7,31 (2H; d; $J=8,2$ Hz), 7,85 (2H; d; $J=8,2$ Hz).

4- 4-Metil-salicilato de metila

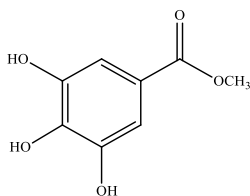


IV (cm⁻¹): 3190, 2954, 1676, 1622, 1440, 1095.

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): δ_C 21,8; 52,1; 109,8; 117,6; 120,4; 129,6; 146,9; 161,5; 170,5.

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): δ_H 2,33 (3H, s), 3,92 (3H, s), 6,68 (1H, dd, $J=8.0, 1.7$ Hz), 6,78 (1H, d, $J=1.7$ Hz), 7,69 (1H, d, $J=8.0$ Hz).

5- Galato de metila

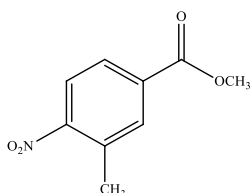


IV (cm⁻¹): 3512, 3458, 3332, 3016, 2953, 1693, 1618, 1037.

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 50 MHz): δ_C 51,7; 108,5; 108,5; 119,3; 138,5; 145,6; 145,6; 166,4.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 200 MHz): δ_H 3,74 (3H; s), 6.94 (2H; s).

6- 3-Metil-4-nitrobenzoato de metila

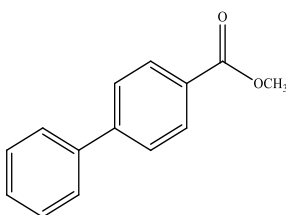


IV (cm⁻¹): 3043, 2958, 1728, 1585, 1514, 1280, 1263, 731.

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 50 MHz): δ_C 19,1; 52,8; 124,8; 128,0; 133,1; 133,3; 133,5; 151,7; 164,9.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 200 MHz): δ_H 2,50 (3H; s), 3,86 (3H; s), 7,91 (1H;dd; $J=8,6, 1,6$ Hz), 8,00 (1H;br s), 8,02 (1H; d; $J=8,6$ Hz).

7- 4-Bifenil carboxilato de metila

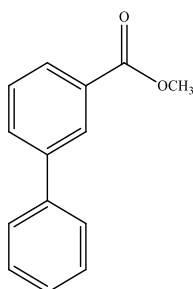


IV (cm⁻¹): 2993, 2972, 1712, 1604, 1288, 1112, 750.

RMN ¹³C (CDCl₃, 50 MHz): δ_C 52,1; 127,0; 127,2; 127,2; 128,1; 128,9; 128,9; 130,1; 130,1; 130,1; 130,1; 140,0; 145,6; 167,0.

RMN ¹H (CDCl₃, 200 MHz): δ_H 3,96 (3H; s), 7,55-7,39 (3H; m), 7,75-7,60 (4H; m), 8,12 (2H; d, $J=8,2$ Hz).

8- 3-Bifenil-carboxilato de metila

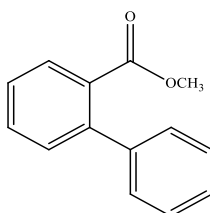


IV (cm⁻¹): 3022, 2953, 1720, 1517, 1207, 756.

RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 50 MHz): δ_C 52,6; 127,1; 127,1; 127,3; 127,5; 128,3; 128,4; 129,5; 129,9; 130,6; 131,8; 139,3; 141,0; 166,6.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 200 MHz): δ_H 3,86 (3H; s), 7,41 (1H; m), 7,46 (1H; m); 7,50 (1H; dd; $J=7,8$, 2,0 Hz), 7,58 (1H; d; $J=7,8$ Hz), 7,66 (2H; m), 7,90 (1H; m), 7,94 (1H; m), 8,15 (1H; m).

9- 2-Bifenil-carboxilato de metila



IV (cm⁻¹): 2949, 1703, 1635, 1516, 1271, 1163, 848, 819.

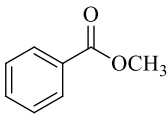
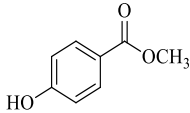
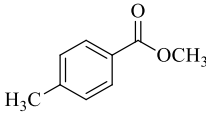
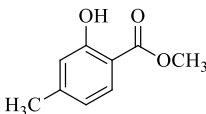
RMN ¹³C (DMSO-*d*₆, 50 MHz): δ_C 51,9; 127,2; 127,3; 128,1; 128,3; 129,1; 129,3; 130,5; 130,9; 131,5; 132,3; 140,9; 140,9; 169,7.

RMN ¹H (DMSO-*d*₆, 200 MHz): δ_H 3,57 (3H; s), 7,28 (1H; dd; $J=7,4$, 1,8 Hz), 7,43-7,32 (5H; m), 7,46 (1H; dd; $J=7,0$, 1,2 Hz), 7,59 (1H; m), 7,73 (1H; d; $J=7,4$, 1,2 Hz).

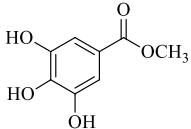
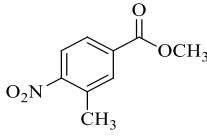
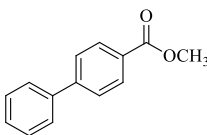
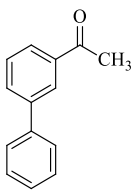
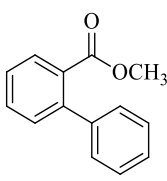
5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS ÉSTERES BENZOICOS PREPARADOS

No presente trabalho foram preparados nove ésteres benzoicos com diferentes substituições no anel aromático, e investigada a capacidade antifúngica dos compostos pelo método de microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos ésteres bioativos; os resultados podem ser observados na **tabela 2**.

Tabela 2: Resultados da avaliação da atividade antifúngica em CIM ($\mu\text{g/mL}$) contra *Candida* spp. dos ésteres preparados

Substâncias ($\mu\text{g/mL}$) / Leveduras	<i>Candida albicans</i> ATCC-76645	<i>Candida albicans</i> LM-106	<i>Candida albicans</i> LM-23	<i>Candida tropicalis</i> ATCC-13803	<i>Candida tropicalis</i> LM-36	<i>Candida krusei</i> LM-13	<i>Candida krusei</i> LM-656	<i>Candida krusei</i> ATCC-6258	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC-22019
 (1)	1024	1024	1024	1024	1024	512	512	*	*
 (2)	512	512	512	1024	1024	512	512	64	64
 (3)	+	+	+	+	+	+	+	>1024	>1024
 (4)	+	+	+	+	+	+	+	>1024	>1024

Continuação da Tabela 2

Substâncias (µg/mL) / Leveduras	<i>Candida albicans</i> ATCC-76645	<i>Candida albicans</i> LM-106	<i>Candida albicans</i> LM-23	<i>Candida tropicalis</i> ATCC-13803	<i>Candida tropicalis</i> LM-36	<i>Candida krusei</i> LM-13	<i>Candida krusei</i> LM-656	<i>Candida krusei</i> ATCC-6258	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC-22019
 (5)	+	+	+	+	+	+	+	>1024	>1024
 (6)	256	256	256	256	512	1024	1024	>1024	>1024
 (7)	256	512	512	256	1024	512	512	>1024	>1024
 (8)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
 (9)	256	128	128	256	256	256	256	>1024	>1024
Controle	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle:nistatina	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: Crescimento do microrganismo. - : Não houve crescimento do microrganismo.

* Teste antifúngico não realizado.

Fonte: Dados da pesquisa.

Na avaliação, a CIM, expressa em $\mu\text{g/mL}$, dos ésteres bioativos foi considerada como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento do microrganismo quando comparado com o controle contendo apenas o meio de cultura e o inóculo. A atividade antifúngica dos compostos foi classificada de acordo com os parâmetros estabelecidos por Sartoratto e colaboradores (2004) e Houghton e colaboradores (2007), dessa forma, aqueles ésteres com CIM entre 50-500 $\mu\text{g/mL}$ são considerados de ótima bioatividade e os que apresentem CIM entre 500-1500 $\mu\text{g/mL}$ são de moderada atividade biológica frente as cepas de *Candida* spp.

Entre os nove ésteres avaliados, a maioria foi bioativa contra as cepas de *Candida* spp, todos demonstraram ter ótima à moderada bioatividade. O 2-bifenil-carboxilato de metila (**9**) foi o composto de melhor bioatividade, apresentando as menores CIMs frente a maioria das cepas. No presente estudo, além de investigar a atividade antifúngica dos ésteres benzoicos contra *Candida* spp., foi feita a análise da influência, na atividade biológica, das características estruturais das substâncias preparadas.

Primeiramente, o benzoato de metila (**1**), composto mais simples, estrutura básica da série preparada e que não possui nenhum substituinte em seu anel aromático, foi bioativo contra todas as cepas com CIMs variando entre 512-1024 $\mu\text{g/mL}$. O seu derivado hidroxilado, o *p*-hidroxibenzoato de metila (**2**), também foi bioativo frente todas as cepas, inibiu as de *Candida albicans* estando em concentrações menores (512 $\mu\text{g/mL}$) do que aquelas apresentadas por **1** (1024 $\mu\text{g/mL}$) e, é importante destacar que **2** inibiu o crescimento das cepas de *C. krusei* (ATCC-6259) e *C. parapsilosis* (ATCC-22019) à uma CIM de 64 $\mu\text{g/mL}$; estes achados indicam que a hidroxila na posição *para* do anel aromático contribui para a melhor bioatividade do éster. Bisogno e colaboradores (2007) demonstraram que ésteres metílicos de ácidos fenilpropanoicos (segunda classe de ácidos orgânicos bastante encontrada na natureza) com o substituinte hidroxila na posição *para* do anel benzênico inibiram o crescimento de fungos fitopatogênicos. Os autores ainda destacaram que alguns ésteres apresentaram uma melhor bioatividade do que os seus ácidos precursores, por inibirem o crescimento fúngico em CIM menores. Vale mencionar que os ésteres do ácido *p*-hidroxibenzoico: -metil, -etil, -propil e -butil, também denominados de parabenos, são conhecidos e muito utilizados em alimentos, cosméticos e produtos farmacêuticos como conservantes antimicrobianos (ALMEIDA et al., 2014).

A substituição da hidroxila na posição *para* do anel aromático (*p*-hidroxibenzoato de metila, **2**) pelo substituinte metila não resultou em uma melhor bioatividade, visto que o *p*-toluato de metila (**3**) foi inativo frente a maioria das cepas de *Candida* spp. É possível

observar que a presença desse substituinte metila na posição *para* do anel benzênico contribuiu para a inatividade de **3**, quando o benzoato de metila (**1**), que não possui nenhum substituinte no anel, mostrou-se bioativo frente a todas as cepas em que foi testado.

O 4-metil-salicilato de metila (**4**) foi inativo frente todas as cepas em que foi testado. Pelas análises anteriores, concluiu-se que o substituinte metila na posição *para* do anel aromático contribuiu para a inatividade do éster **3**, em **4**, além da metila, tem uma hidroxila na posição *orto*, nesse caso e nessa posição, essa hidroxila não apresentou ser significativa para a bioatividade do éster ou também contribuiu para a inatividade, como a metila, já que **4** foi inativo frente as cepas da avaliação. Segundo Amborabé e colaboradores (2002) o salicilato de metila, o qual contém apenas essa hidroxila na posição *orto* foi inativo frente um fungo fitopatogênico conhecido por *Eutypia lata*. Os autores atribuem a inatividade ao fato do composto não ter mais o grupo funcional carboxílico (COOH), já que, em testes feitos com o ácido salicílico, este inibiu o crescimento do fungo; os autores também atribuem a bioatividade do ácido ao arranjo molecular, particularmente à presença dessa hidroxila na posição *orto*, já que quando esta foi substituída, a bioatividade do ácido salicílico diminuiu.

O galato de metila (**5**) foi inativo frente a todas as cepas de *Candida* spp. testadas. Fujuta e Kubo (2002) demonstraram que a atividade antimicrobiana de galatos seria dependente tanto da porção hidrofílica do composto, como do tamanho da cadeia carbônica alifática. Os autores constataram a capacidade antifúngica do galato de octila frente *Saccharomices cerevisiae* e *Aspergillus niger*; mostraram também que o galato de propila, inativo, não teria uma cadeia carbônica longa o suficiente para garantir a bioatividade. Segundo os autores, o galato de octila ligaria-se à membrana da célula fúngica através de ligações de hidrogênio entre as hidroxilas do anel benzênico e a porção hidrofílica da membrana, ele seria rapidamente absorvido, causando diminuição da fluidez da membrana; dessa forma, a capacidade antifúngica do galato de octila seria através da desorganização da membrana fúngica acarretando em alterações de mecanismos de transporte membranar e até mesmo, perda do material intracelular.

O 3-metil-4-nitrobenzoato de metila (**6**) mostrou-se bioativo contra todos os microrganismos testados e inibiu o crescimento das cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* com concentrações consideradas ótimas (256-512µg/mL). Segundo a revisão de Paula, Serrano e Tavares (2009), a atividade biológica de muitas moléculas e até fármacos amplamente utilizados atualmente é dependente da presença do grupamento nitro em sua estrutura; este (que em **6** está como substituinte na posição *para* do anel aromático), de uma maneira geral, apresenta uma facilidade de redução por consequência do seu caráter fortemente aceptor de

elétrons. No espaço intracelular de bactérias, fungos ou parasitas, tal mecanismo pode gerar um acúmulo de radicais livres que desestabilizam a membrana celular e podem interromper processos importantes para o funcionamento da célula ligando-se a moléculas essenciais para o microrganismo. Rozenski; De Ranter e Verplanken (1995) relacionaram a atividade antibacteriana de alguns nitrocompostos com essa capacidade redutora do grupo nitro. O mecanismo de ação de nitrocompostos não é totalmente esclarecido e pode variar com as diferenças estruturais dos mesmos, mas a ativação biológica através desse processo de redução do grupo nitro apresenta-se como um alvo para aperfeiçoar a bioatividade de compostos que apresentem tal grupamento (PAULA; SERRANO; TAVARES, 2009).

Tendo em mente o que foi discutido anteriormente e de acordo com o resultado apresentado, é possível perceber que, para a maioria das cepas testadas, o éster **6** foi mais interessante do que **1**, isso pode ser por conta da presença do grupo nitro na posição *para* do anel aromático e, analisando apenas essa posição, pode-se dizer que o grupamento –NO₂ foi mais significativo para a melhor bioatividade (de **6**, no caso) nas cepas de *C. albicans* e *C. tropicalis* do que a hidroxila (éster **2**) ou a metila (éster **3**).

Analisando os ésteres 4-bifenil-carboxilato de metila (**7**), 3-bifenil-carboxilato de metila (**8**) e 2-bifenil-carboxilato de metila (**9**); observa-se que tanto a presença como a posição de um segundo anel aromático como substituinte foi relevante para a bioatividade dos ésteres. Quando o anel substituinte encontra-se na posição *meta* do anel benzênico (**8**) o composto é inativo; é possível afirmar que o anel nessa posição resultou na inatividade de **8**, já que o benzoato de metila (**1**) foi bioativo contra todas as cepas em quem foi testado. Tendo o segundo anel aromático como substituinte nas posições *para* e *orto*, **7** e **9** respectivamente, melhorou a bioatividade dos compostos em questão. Comparando **7** com **1**, ele inibiu todas cepas, na maioria dos casos com CIMs menores do que aquelas apresentadas por **1**, destacando *C. albicans* (ATCC-76645) e *C. tropicalis* (ATCC-13803) em que a CIM de **7** (256µg/mL) foi consideravelmente menor do que de **1** (1024µg/mL), apresentando, nos dois casos, ótima bioatividade.

Continuando a análise dos ésteres bifenílicos; ao comparar **9** à **1**, pode-se observar que **9** inibiu todas as cepas de *Candida* spp. em que ambos foram testados estando em CIMs (128-256 µg/mL) significativamente menores do que as apresentadas por **1** (512-1024 µg/mL). A melhor bioatividade de **9** é decorrente da presença do segundo anel, como substituinte na posição *orto*, já que essa é a diferença estrutural entre **9** e **1**.

6. CONCLUSÕES

Foram preparados nove ésteres estruturalmente relacionados, utilizando o ácido benzoico e alguns de seus derivados ácidos como materiais de partida que diferenciaram entre si apenas pela presença de substituinte(s) do anel aromático da estrutura base da série. Todos os produtos foram obtidos com certa facilidade e apresentando bons rendimentos.

Na avaliação da atividade antifúngica dos produtos contra *Candida* spp., a maioria demonstrou ser bioativa, inibindo o crescimento fúngico em concentrações que variaram de ótimas à moderadas.

Na análise da influência dos substituintes na bioatividade dos ésteres, foi possível observar que: a metila na posição *para* do anel não foi importante para a bioatividade; a hidroxila como substituinte foi interessante para a atividade antifúngica de alguns derivados e pode, na interação com as células dos microrganismos, realizar interações de hidrogênio com componentes membranares; o substituinte nitro na posição *para* pode ter sido relevante para a melhor bioatividade e um anel aromático como substituinte nas posições *orto* ou *para* foi significativo para a melhor bioatividade dos respectivos ésteres.

A partir dos resultados é possível avançar no estudo de um produto que tenha melhor perfil biológico, realizar estudos mais aprofundados que possam vir a contribuir nas pesquisas por novos fármacos com atividade antifúngica.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, Ana R. R. P. et al. Thermodynamic properties of the methyl esters of p-hydroxy and p-methoxy benzoic acids. **The Journal of Chemical Thermodynamics**, v. 78, p. 43–57, 2014.
- ALMEIDA, Vera L. et al. Estudos de relação estrutura-atividade quantitativas (QSAR) de bis-benzamidinas com atividade antifúngica. **Química Nova**, v. 33, n. 7, p. 1482–1489, 2010.
- AMBORABÉ, Bénigne-Ernest, et al. Antifungal effects of salicylic acid and other benzoic acid derivatives towards *Eutypa lata*: Structure-activity relationship. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 40, n. 12, p. 1051–1060, 2002.
- ARAÚJO, José Endrigo Tinoco, et al. Candidíase invasiva e alterações bucais em recém-nascidos prematuros. **Einstein**, v. 11, n. 1, p. 71–75, 2013.
- ARENDRUP, Maiken C.; PERLIN, David S. Echinocandin resistance. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 27, n. 6, p. 484–492, 2014.
- ARROIO, A.; HONÓRIO, K. M.; DA SILVA, A. B. F. Propriedades químico-quânticas empregadas em estudos das relações estrutura-atividade. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 694–699, 2010.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191–203, 2006.
- BARBEDO, Leonardo S.; SGARBI, Diana B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22–38, 2010.
- BISOGNO, F. et al. Structure-antifungal activity relationship of cinnamic acid derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 26, p. 10635–10640, 2007.
- BRAVO, L.; SOURCES, D.; SIGNIFICANCE, N. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition reviews**, v. 56, n. 11, p. 317–333, 1998.
- BRUL, S.; COOTE, P. Preservative agents in foods: Mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal of Food Microbiology**, v. 50, n. 1-2, p. 1–17, 1999.
- CARTA, Fabrizio. et al. Carbonic anhydrase inhibitors. Inhibition of the β -class enzymes from the fungal pathogens *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* with branched aliphatic/aromatic carboxylates and their derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 21, n. 8, p. 2521–2526, 2011.
- CLELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “*in vitro*” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts Approved Standard M27-A3**. 3^o ed: Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, PA, 2008.

COLOMBO, Arnaldo Lopes, et al. Brazilian guidelines for the management of candidiasis - a joint meeting report of three medical societies: Sociedade Brasileira de Infectologia, Sociedade Paulista de Infectologia and Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 17, n. 3, p. 283–312, 2013.

CONTI, Heather R.; GAFFEN, Sarah L. Host responses to *Candida albicans*: Th17 cells and mucosal candidiasis. **Microbes and Infection**, v. 12, n. 7, p. 518–527, 2010.

COSTA, Catarina; TEIXEIRA, Miguel C. Multiresistência em infecções provocadas por leveduras do género *Candida*: o papel de proteínas que catalisam o efluxo de fármacos. **Magazine da SPM**, v. 4, n. 4, p. 1–7, 2015.

EDDOUZI, Jamel, et al. Molecular mechanisms of drug resistance in clinical *Candida* species isolated from tunisian hospitals. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 57, n. 7, p. 3182–3193, 2013.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711–713, 1978.

FUJITA, Ken-Ichi; KUBO, Isao. Antifungal activity of octyl gallate. **International Journal of Food Microbiology**, v. 79, n. 3, p. 193–201, 2002.

HADACEK, F. GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137–147, 2000.

HOUGHTON, P. J. et al. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: Visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 110. p. 391–400, 2007.

HELENO, Sandrina A. et al. Antimicrobial and demelanizing activity of *Ganoderma lucidum* extract, p-hydroxybenzoic and cinnamic acids and their synthetic acetylated glucuronide methyl esters. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 95–100, 2013.

HOLANDA, Antônio Arildo Reginaldo de, et al. Candidíase vulvovaginal: sintomatologia, fatores de risco e colonização anal concomitante. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 1, p. 3–9, 2007.

HUSEIN Ahmad I., et al. Synthesis and biological evaluation of novel mono acid esters derived from the constituents of *Urtica pilulifera*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. July 2013, p. 1173–1181, 2014.

KANE, C. J. M. et al. Methyl gallate, methyl-3,4,5-trihydroxybenzoate, is a potent and highly specific inhibitor of herpes simplex virus *in vitro*. II. Antiviral activity of methyl gallate and

its derivatives. **Bioscience reports**, v. 8, n. 1, p. 95–102, 1988.

KARKOWSKA-KULETA, J.; RAPALA-KOZIK, M.; KOZIK, A. Fungi pathogenic to humans. **Acta Biochimica Polonica**, v. 56, n. 2, p. 211–224, 2009.

KENAWY, E. R. et al. Synthesis and antimicrobial activity of some polymers derived from modified amino polyacrylamide by reacting it with benzoate esters and benzaldehyde derivatives. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 99, n. 5, p. 2428–2437, 2006.

KRÁTKÝ, M. et al. Synthesis and in vitro biological evaluation of 2-(phenylcarbamoyl)phenyl 4-substituted benzoates. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 23, n. 4, p. 868–875, 2015.

KRÁTKÝ, M.; VINŠOVÁ, J.; BUCHTA, V. *In Vitro* Antibacterial and Antifungal Activity of Salicylanilide Benzoates. **The Scientific World Journal**, v. 2012, n. Mic, p. 1–7, 2012.

LAMBERT, R. J.; STRATFORD, M. Weak-acid preservatives: Modelling microbial inhibition and response. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n. 1, p. 157–164, 1999.

LI, X.; ELI, W.; LI, G. Solvent-free synthesis of benzoic esters and benzyl esters in novel Bronsted acidic ionic liquids under microwave irradiation. **Catalysis Communications**, v. 9, n. 13, p. 2264–2268, 2008.

LÓPEZ, A.; MING, D. S.; TOWERS, G. H. N. Antifungal Activity of Benzoic Acid Derivatives from *Piper l anceaefolium*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 1, p. 62–64, 2002.

MAUBON, Danièle, et al. Resistance of *Candida* spp. to antifungal drugs in the ICU: Where are we now? **Intensive Care Medicine**, v. 40, n. 9, p. 1241–1255, 2014.

MCCARTY, Todd P.; PAPPAS, Peter G. Invasive Candidiasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 30, n. 1, p. 103–124, 2015.

MORAES A. M. L.; PAES, R. A.; HOLANDA, V. L. Micologia. In: TEVA, Antônio, et al. **Conceitos e Métodos para a Formação de Técnicos em Laboratórios de Saúde**. Rio de Janeiro: EPSJV, 2009. Cap. 4, p. 399–496.

NGUYEN, Phi H. et al. Isolation of benzoic and cinnamic acid derivatives from the grains of *Sorghum bicolor* and their inhibition of lipopolysaccharide-induced nitric oxide production in RAW 264.7 cells. **Food Chemistry**, v. 168, p. 512–519, 2015.

OLIVEIRA, Jeferson Carvalhães de. Candidíase (Monilíase). In: OLIVEIRA, Jeferson Carvalhães de. **Tópicos em Micologia Médica**. Rio de Janeiro, 2014. Cap. 2, p. 76–82.

OLIVEIRA, C. A. et al. Síntese de ésteres de aromas de frutas: Um experimento para cursos de graduação dentro de um dos princípios da química verde. **Revista Virtual de Química**, v. 6, n. 1, p. 152–167, 2014.

PANIZO, María Mercedes, et al. *Candida* spp. in vitro susceptibility profile to four antifungal agents. Resistance surveillance study in Venezuelan strains. **Medical Mycology**, v. 47, n. 2,

p. 137–43, 2009.

PAULA, F. R.; SERRANO, S. H. P.; TAVARES, L. C. Aspectos mecanísticos da bioatividade e toxicidade de nitrocompostos. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1013–1020, 2009.

PEIXOTO, Juliana Vieira, et al. Candidíase: uma revisão de literatura. **Brasilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 8, n. 2, p. 75–82, 2014.

PLODPAI, P. et al. Desmos chinensis: A new candidate as natural antifungicide to control rice diseases. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 1, p. 324–331, 2013.

PODOBNIK, B. et al. CYP53A15 of *Cochliobolus lunatus*, a target for natural antifungal compounds. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 51, n. 12, p. 3480–3486, 2008.

POPOVA, Milena, et al. The specific chemical profile of Mediterranean propolis from Malta. **Food Chemistry**, v. 126, n. 3, p. 1431–1435, 2011.

REFAAT, John et al. Chemical constituents from *Chorisia chodatii* flowers and their biological activities. **Medicinal Chemistry Research**, v. 24, n. 7, p. 2939–2949, 2015.

ROZENSKI, J.; DE RANTER, C. J.; VERPLANKEN, H. Quantitative structure-activity relationships for antimicrobial nitroheterocyclic drugs. **Quantitative Structure-Activity Relationships**, v. 14, n. 2, p. 134–141, 1995.

SANGLARD, Dominique. Resistance of human fungal pathogens to antifungal drugs. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 379–385, 2002.

SANGUINETTI, M.; POSTERARO, B.; LASS-FLORL, C. Antifungal drug resistance among *Candida* species: Mechanisms and clinical impact. **Mycoses**, v. 58, n. S2, p. 2–13, 2015.

SARTORATTO, Adilson, et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275–280, 2004.

SIDRIM, José J. C.; ROCHA, Marcos F. G. Candidíase. In: SIDRIM, José J. C.; ROCHA, Marcos F. G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. Guanabara Koogan, 2004. Caps. 2 (p. 25–26), 5 (p. 41–42) 9 (p. 89), 25 (p. 265–274).

SILVA, Sônia, et al. *Candida glabrata*, *Candida parapsilosis* and *Candida tropicalis*: Biology, epidemiology, pathogenicity and antifungal resistance. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 36, n. 2, p. 288–305, 2012.

SOLOMONS, Graham; FRYHLE, Craig. Ácidos Carboxílicos e seus Derivados. Adição-Eliminação Nucleofílica do Carbono Acílico. In: SOLOMONS, Graham; FRYHLE, Craig. **Química Orgânica**. vol. 2, 10^o ed: LTC, 2012. Cap. 17, p. 795–799.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 409–413, 2007.

SPAMPINATO, Claudia; LEONARDI, Dário. *Candida Infections , Causes , Targets , and Resistance Mechanisms : Traditional and Alternative Antifungal Agents*. v. 2013, 2013.

STRIPPOLI, V. et al. Propyl gallate increases in vitro antifungal imidazole activity against *Candida albicans*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 16, n. 1, p. 73–76, 2000.

ŚWISŁOCKA, R. et al. Experimental and theoretical study on benzoic acid derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 1044, p. 181–187, 2013.

TRUSHEVA, Boryana, et al. Antibacterial mono- and sesquiterpene esters of benzoic acids from Iranian propolis. **Chemistry Central journal**, v. 4, p. 8, 2010.

WILLE, Marcos Paulo, et al. Historical trends in the epidemiology of candidaemia: Analysis of an 11-year period in a tertiary care hospital in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 3, p. 288–292, 2013.